

EP 04103684



Europäisches  
Patentamt

European  
Patent Office

Office européen  
des brevets

REC'D 22 JUN 2004

WIPO

PCT

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterla-  
gen stimmen mit der  
ursprünglich eingereichten  
Fassung der auf dem näch-  
sten Blatt bezeichneten  
europäischen Patentanmel-  
dung überein.

The attached documents  
are exact copies of the  
European patent application  
described on the following  
page, as originally filed.

Les documents fixés à  
cette attestation sont  
conformes à la version  
initialement déposée de  
la demande de brevet  
européen spécifiée à la  
page suivante.

BEST AVAILABLE COPY

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

03008456.0

Der Präsident des Europäischen Patentamts;  
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets  
p.o.

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

R C van Dijk



Anmeldung Nr:  
Application no.: 03008456.0  
Demande no:

Anmeldetag:  
Date of filing: 11.04.03  
Date de dépôt:

Anmelder/Applicant(s)/Demandeur(s):

BRACCO IMAGING S.p.A.  
Via E. Folli 50  
20134 Milano  
ITALIE

Bezeichnung der Erfindung/Title of the invention/Titre de l'invention:  
(Falls die Bezeichnung der Erfindung nicht angegeben ist, siehe Beschreibung.  
If no title is shown please refer to the description.  
Si aucun titre n'est indiqué se référer à la description.)

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed /Priorité(s)  
revendiquée(s)  
Staat/Tag/Aktenzeichen/State/Date/File no./Pays/Date/Numéro de dépôt:

Internationale Patentklassifikation/International Patent Classification/  
Classification internationale des brevets:

A61K49/00

Am Anmeldetag benannte Vertragstaaten/Contracting states designated at date of  
filing/Etats contractants désignées lors du dépôt:

AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LU MC NL  
PT SE SI SK TR LI

**ADDOTTI FRA REAGENTI DI SHIFT DI RISONANZA MAGNETICA  
E SUBSTRATI CONTENENTI PROTONI SCAMBIABILI PER  
APPLICAZIONI CEST**

La presente invenzione riguarda addotti paramagnetici utili in procedure di Magnetic Resonance Imaging (MRI) che utilizzano il trasferimento di saturazione per creare contrasto nell'immagine.

**Sfondo dell'invenzione**

5        La generazione del contrasto in un'immagine MRI attraverso l'irradiazione di protoni mobili nei tessuti è già stata riportata in US 5,050,609. L'uso di agenti di contrasto esogeni (detti originariamente agenti CEDST, attualmente agenti CEST) contenenti almeno un protone mobile in scambio con l'acqua è stato descritto in WO 00/66180. In questo documento  
10       non si fa esplicito riferimento alla possibilità di utilizzare complessi paramagnetici come agenti CEST. I composti preferiti sono molecole diamagnetiche quali zuccheri, aminoacidi, composti eterociclici, nucleosidi, imidazoli e derivati, guanidina, etc...

      Nello stesso documento, sono anche rivendicati metodi per la  
15       determinazione in vitro ed in vivo di pH, temperatura e concentrazione di metaboliti mediante la somministrazione di un agente di contrasto avente due set di protoni mobili magneticamente non equivalenti. L'irradiazione selettiva dei due pool consente, attraverso l'applicazione di un metodo raziometrico, di misurare un effetto di trasferimento indipendente dalla concentrazione del  
20       mezzo di contrasto. Il trasferimento di saturazione implica che i protoni mobili dell'agente CEST non siano in coalescenza con l'acqua di bulk, ciò significa che la separazione tra le frequenze di risonanza dei due set di protoni mobili deve essere maggiore della velocità di scambio. Inoltre, l'entità del trasferimento è direttamente proporzionale alla velocità di scambio dei protoni

dell'agente e quindi un aumento nella separazione delle frequenze di risonanza dei due segnali in scambio determina un aumento nell'efficienza del trasferimento di saturazione. Per questo motivo è stato considerato l'utilizzo di agenti di contrasto CEST paramagnetici (WO 02/43775) dove si rivendica  
5 l'uso di complessi paramagnetici dotati di protoni mobili il cui trasferimento di saturazione (migliore rispetto ai composti diamagnetici esemplificati in US 5050609) può essere sensibile a parametri di interesse diagnostico quali pH, temperatura e concentrazione di metaboliti, etc..

Nei documenti citati e nella letteratura non è stata tuttavia presa in  
10 considerazione la possibilità di utilizzare come agenti CEST sistemi costituiti da addotti non covalenti formati da un substrato dotato di protoni in scambio con l'acqua di bulk (anche con tipologie analoghe a quelli esemplificati nel brevetto US 5050609) e da un complesso paramagnetico capace di aumentare la separazione dall'acqua di bulk delle loro frequenze di risonanza. Con  
15 questo approccio l'agente paramagnetico sarà scelto in base alle sue caratteristiche di Reagente di Shift (SR) rispetto alle proprietà del composto contenente i protoni scambiabili.

#### **Descrizione dell'invenzione**

La presente invenzione riguarda la preparazione e l'utilizzo di agenti  
20 CEST paramagnetici in cui il chemical shift dei protoni mobili che devono essere irradiati per osservare il trasferimento di saturazione sia stato opportunamente "shiftato" a seguito dell'interazione del substrato con un chelato paramagnetico contenente un metallo scelto fra ferro (II) (configurazione alto spin), ferro (III), cobalto (II), rodio(II), rame (II), nickel  
25 (II), cerio (III), praseodimio (III), neodimio (III), disprosio (III), erbio (III), terbio (III), olmio (III), tulio (III), itterbio (III) ed europio (III). I protoni mobili possono appartenere a substrati diamagnetici o paramagnetici, fermo restando che in quest'ultimo caso il loro chemical shift sia influenzato

dall'interazione non covalente con la specie paramagnetica.

In un suo primo aspetto, l'invenzione fornisce pertanto agenti CEST paramagnetici costituiti da substrati diamagnetici contenenti protoni mobili (unità SH) legati per mezzo di interazioni elettrostatiche o di legami covalenti a chelati paramagnetici (unità SR) che interagiscono reversibilmente con i substrati stessi.

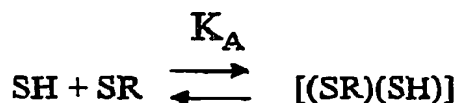
L'invenzione fornisce inoltre composizioni diagnostiche contenenti gli agenti CEST come sopra definiti in miscela con un veicolo opportuno.

Come molecole dotate di protoni mobili possono essere impiegate tutte quelle già descritte in US 5050609 e in WO 00/66180, con particolare preferenza per poliamine lineari e macrocicliche, come il cyclen (1,4,7,10-tetraazaciclododecano), poliaminoacidi, come la poliarginina, proteine quali albumina umana del siero, polisaccaridi, poliaciclodestrine, polimeri sintetici (poliamidoamine, poliaminoacidi peramidati, dendrimeri contenenti gruppi amidici). Cyclen, poliarginina e albumina sono particolarmente preferite.

I protoni scambiabili possono anche appartenere a molecole di acqua che, a seguito dell'interazione con il substrato SH e per la natura dell'addotto [(SR)(SH)], vengano ad essere "shiftate" dal segnale dell'acqua di bulk e siano in adatte condizioni di scambio con essa. Rientrano in questa categoria di sostanze SH, sistemi polisaccaridici, in particolare sistemi capaci di formare aggregati supramolecolari in grado di intrappolare molecole di acqua e unità SR. Un'ulteriore estensione di questo concetto include qualsiasi sistema in cui SR e molecole di acqua siano intrappolati nello stesso compartimento e, nello stesso tempo, le molecole di acqua (il cui chemical shift è influenzato dall'unità SR) siano in adatte condizioni di scambio con l'acqua di bulk. Un elenco non esaustivo di sistemi utilizzabili per ottenere tale compartimentalizzazione include liposomi, sistemi nano- e micro-vescicolari, cavità proteiche e cellule.

Gli addotti dell'invenzione possono essere preparati per semplice miscelazione delle molecole dotate di protoni mobili con i chelati paramagnetici, in rapporti molari opportuni che dipendono dall'affinità tra il substrato e l'unità SR:

5



Tale affinità può essere espressa dal valore della costante termodinamica di associazione ( $K_A$ ) che deve essere superiore a 10. Gli addotti possono poi essere isolati e purificati con tecniche cromatografiche e/o  
10 per liofilizzazione, precipitazione, evaporazione e simili.

Secondo una prima forma di realizzazione dell'invenzione, l'unità SR possiede caratteristiche chimiche capaci di riconoscere la porzione della molecola substrato contenente i protoni mobili in modo da influenzare significativamente il loro chemical shift. da irradiare. Ad esempio, nel caso di  
15 addotti fra  $[\text{LnDOTP}]^{4-}$  (Ln è un lantanide) e i substrati preferiti, cyclen, poliarginina e HSA, l'interazione avviene attraverso legami di natura elettrostatica.

Altri esempi riguardanti l'interazione elettrostatica tra substrato ed unità SR sono quelli in cui il  $[\text{LnDOTP}]^{4-}$  è in grado di influenzare il valore del  
20 chemical shift dei protoni mobili di molecole diamagnetiche quali Co(III)-sarcofagina, Co(III)-(etilendiamina)<sub>3</sub> e agmatina.

Il riconoscimento substrato-unità SR può anche avvenire attraverso interazioni idrofobiche (per es. nel caso di poliacilodestrine) o miste (per es. nel caso di proteine).

25 Alternativamente, l'unità SR può essere intrappolata in sistemi polimerici ad alta biocompatibilità come idrogeli o proteine reticolate nei quali è in grado di esercitare il proprio effetto nei confronti delle molecole di acqua in scambio lento presenti all'interno di tali sistemi.

Inoltre, sistemi di interesse sono anche quelli in cui la differenziazione tra i pool dei protoni scambiabili avvenga a seguito di effetti di compartimentalizzazione.

Secondo questa forma di realizzazione dell'invenzione, l'unità SR ed il substrato SH possono essere compartimentalizzati all'interno di opportuni sistemi biocompatibili quali liposomi, nanoparticelle, microemulsioni, cavità proteiche (es. apoferritina), nei quali l'acqua (a differenza dell'unità SR e del substrato) possa liberamente scambiare tra l'interno e l'esterno del compartimento. In questo modo l'effetto dell'unità SR potrebbe anche manifestarsi attraverso una semplice variazione di suscettività magnetica, capace di influenzare la frequenza di risonanza dei protoni mobili del substrato all'interno del compartimento senza presupporre una loro interazione, con il vantaggio di rendere pressoché costante la frequenza di irradiazione dei protoni mobili del substrato.

Se l'agente SH-SR viene compartimentalizzato in un sistema in cui la velocità di scambio dell'acqua tra l'interno e l'esterno del compartimento è molto lenta e qualora la quantità di acqua nel comparto contenente l'unità sia sufficiente per poterla osservare nell'immagine MR, l'effetto del trasferimento di saturazione potrebbe essere notevolmente amplificato a causa dell'aumento della concentrazione locale di SR e del substrato contenente i protoni mobili.

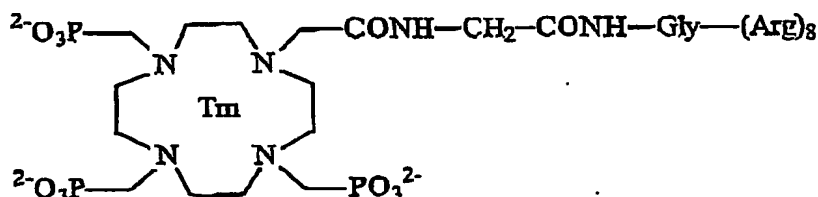
In alternativa, l'agente di shift può essere scelto allo scopo di influenzare la sola risonanza del segnale dell'acqua di bulk. Questo effetto determinerebbe in ogni caso un aumento della separazione delle frequenze di risonanza tra acqua e substrato consentendo l'irradiazione dei protoni mobili di quest'ultimo. Un esempio di questo tipo, non pertinente all'ambito CEST, è stato riportato da Otting et al. (J. Am. Chem. Soc., 1991, 113, 4363) che hanno utilizzato Co(II) allo scopo di "spostare" il segnale dell'acqua di bulk permettendo così l'osservazione di molecole di acqua intrappolate in un sito

6

della proteina BPTI nel quale l'agente di shift non è in grado di entrare.

L'unità SR e l'unità SH possono essere anche coniugati attraverso un legame covalente, così da garantire la stessa biodistribuzione delle due unità in vivo. In questo caso l'effetto dell'unità SR non si esplica intramolecolarmente nei confronti dei protoni dell'unità SH, bensì in termini intermolecolari, attraverso un meccanismo di auto-riconoscimento/auto-aggregazione.

Un composto preferito all'interno di questa categoria è il seguente:



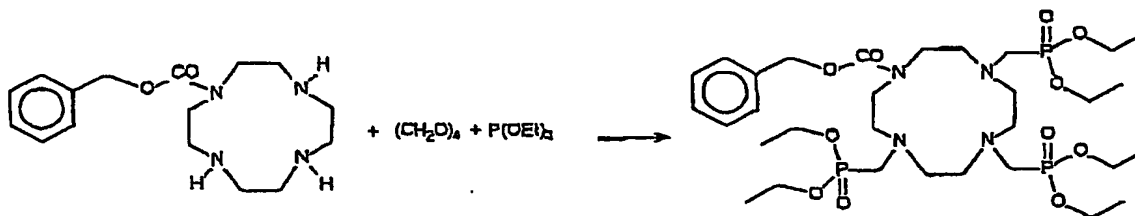
10

nel quale l'auto-riconoscimento intermolecolare avviene tra un'unità SR carica negativamente di una molecola e la catena poliargininica positiva di un'altra molecola. In questo composto la scelta del numero di residui di arginina sulla catena laterale è stata anche dettata dal fatto che il motivo strutturale (Arg)<sub>8</sub>, reminiscente del frammento peptidico 48-60 del virus HIV-1, è noto per la sua capacità di essere riconosciuto ed internalizzato dalle cellule (Suzuki et al., J. Biol. Chem., 2002, 277, 2437).

15

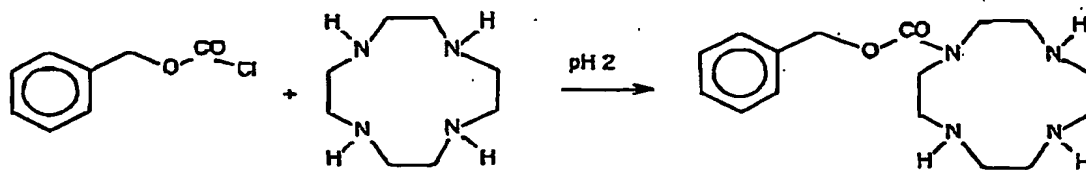
Tale composto può essere preparato secondo il seguente schema di sintesi:

20

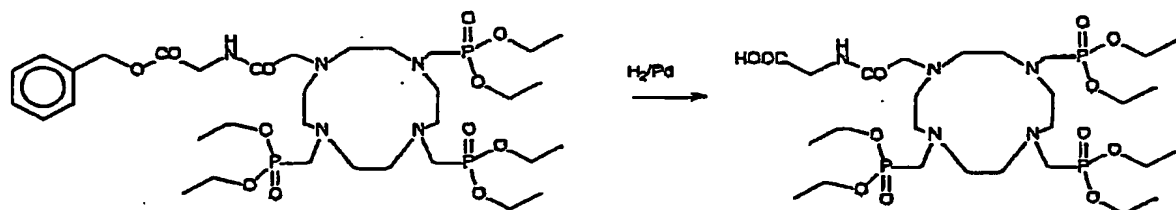
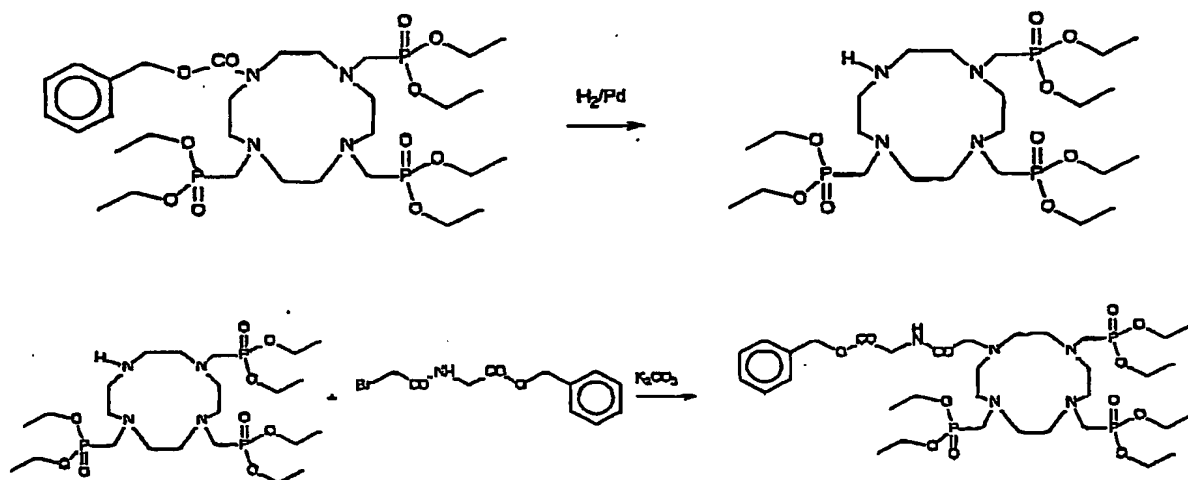




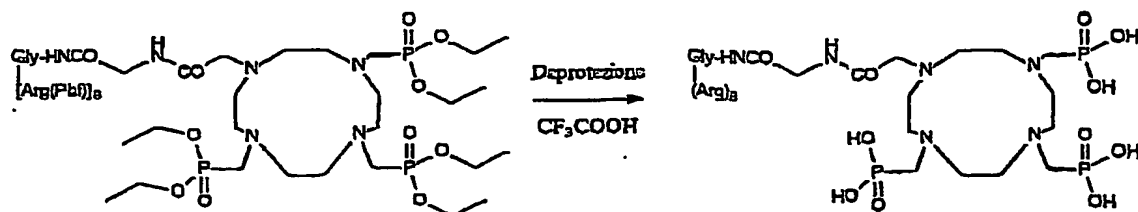
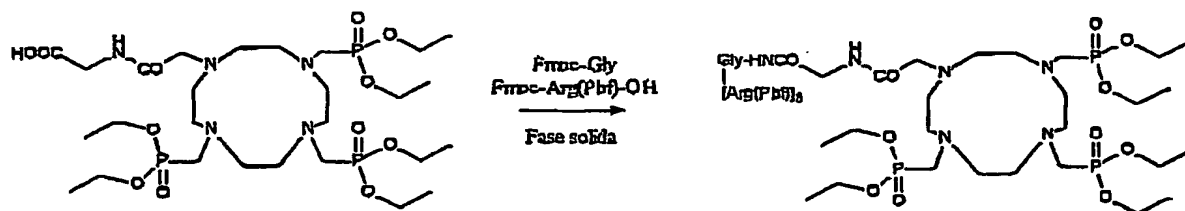
7



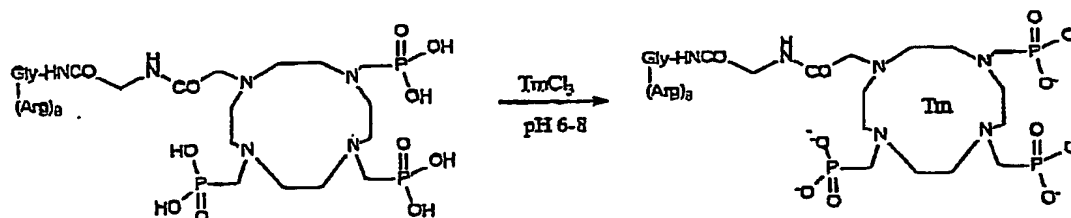
5



10



8



Per i previsti impieghi diagnostici, gli agenti secondo l'invenzione saranno formulati in opportune composizioni adatte alla somministrazione parenterale.

Le composizioni diagnostiche dell'invenzione possono essere utilizzate per la determinazione di parametri chimico-fisici di interesse diagnostico quali temperatura, pH, concentrazione di metaboliti, pressioni parziali di O<sub>2</sub> or CO<sub>2</sub> e attività enzimatiche in un tessuto o organismo umano o animale per mezzo della metodica CEST. A questo fine la composizione diagnostica preferibile dovrà contenere due set magneticamente diversi di protoni mobili il cui effetto di trasferimento deve essere preferibilmente diverso nei confronti del parametro chimico-fisico di interesse. In questo modo, attraverso l'utilizzo di un metodo raziometrico (già descritto in WO 00/66180), è possibile determinare il parametro diagnostico indipendentemente dalla concentrazione locale della composizione diagnostica.

Un'altra applicazione preferita riguarda la possibilità di utilizzare tali sistemi al fine di ottenere informazioni sulla permeabilità endoteliale. A tal scopo attualmente vengono impiegati agenti diagnostici convenzionali (cioè agenti sul T<sub>1</sub> o T<sub>2</sub> dei protoni dell'acqua) (Min-Ying S. et al, Magn. Res. Med. 1998, 39, 259-269) utilizzando la tecnica del DCE-MRI (DCE = Dynamic Contrast Enhanced). Il metodo consiste nella somministrazione di agenti diagnostici di dimensioni diverse (come tali o a seguito dell'interazione con macromolecole come l'HSA) allo scopo di valutare la permeabilità dei capillari. La valutazione quantitativa della permeabilità capillare viene

condotta attraverso uno studio cinetico che richiede l'impiego successivo dei diversi agenti diagnostici. Attraverso la modalità CEST, invece, è possibile valutare l'extravasazione di ciascuna unità SR (o viceversa di ciascuna unità SH) dal momento che il contrasto può essere "stimolato" mediante l'irradiazione selettiva dei segnali del sistema diagnostico. Su questa base, si possono utilizzare unità SR di diverse dimensioni capaci di spostare diversamente (per es. cambiando il metallo paramagnetico) il segnale dei protoni mobili del substrato SH. L'identificazione della/e specie che riescono ad oltrepassare l'endotelio permette la realizzazione dello studio cinetico a seguito di un'unica somministrazione.

In alternativa, lo stesso obiettivo può essere raggiunto utilizzando la stessa unità-SR e modulando le dimensioni e la tipologia del substrato interagente al fine di variare la frequenza di risonanza dei suoi protoni mobili. Un analogo risultato può essere ottenuto attraverso l'utilizzo di sistemi compartimentalizzati con dimensioni diverse nei quali l'identificazione dell'agente diagnostico che riesce ad oltrepassare l'endotelio può essere facilmente eseguita attraverso un'appropriata formulazione della soluzione contenuta all'interno del sistema prescelto (liposoma, nanosfera, etc.).

Le composizioni comprendono preferibilmente un addotto dell'invenzione in concentrazioni molari comprese tra circa 0.001 e 1.0 M, in miscela con un veicolo opportuno.

Le composizioni dell'invenzione possono essere opportunamente somministrate per via intravasale (per esempio per via endovenosa, intraarteriale, intraventricolare) oppure per via intratecale, intraperitoneale, intralinfatica, intracavitale, orale o enterale.

Forme preferite sono soluzioni o sospensioni acquose sterili, pronte all'uso o in forma di liofilizzato da ricostituire con solvente sterile immediatamente prima dell'uso. A seconda delle specifiche esigenze

diagnostiche, i dosaggi potranno variare tra 0.01 e 0.5 mmol/kg di peso corporeo.

L'invenzione è descritta in maggior dettaglio nei seguenti esempi.

#### **Esempio 1**

5 Spettro CEST di una soluzione 0.1 mM di poliarginina (DP 227) a pH 6.5, 312 K, 7.05 T, tempo di irradiazione 10 s.

Lo spettro (Figura 1) indica l'intensità del segnale NMR dell'acqua di bulk in funzione della frequenza irradiata riportata in ppm rispetto all'acqua.

10 Si notano i due picchi CEST intorno a 2 ppm e a 4 ppm dall'acqua indicanti rispettivamente il trasferimento di saturazione causato dall'irradiazione dei protoni guanidinici e del backbone amidico del polimero.

#### **Esempio 2**

Spettro CEST di una soluzione 0.1 mM di poliarginina (DP 227) a pH 7.2, 312 K, 7.05 T, tempo di irradiazione 10 s.

15 Lo spettro (Figura 2) evidenzia che l'aumento della velocità di scambio dei protoni del polimero causato dall'aumento del pH determina la loro coalescenza con il segnale dell'acqua di bulk.

#### **Esempio 3**

20 Spettro CEST di una soluzione 0.5 mM di poliarginina (DP 227) in presenza di 2.5 mM di [YbDOTP]<sup>4-</sup> a pH 6.5, 312 K, 7.05 T, tempo di irradiazione 4 s.

Lo spettro (Figura 3) mostra l'effetto dell'unità SR sulla frequenza di risonanza del substrato.

#### **Esempio 4**

25 Spettro CEST di una soluzione 0.5 mM di poliarginina (DP 227) in presenza di 2.5 mM di [YbDOTP]<sup>4-</sup> a pH 7.2, 312 K, 7.05 T, tempo di irradiazione 4 s.

Lo spettro (Figura 4) mostra che aumentando il pH della soluzione

l'effetto dell'unità SR consente di misurare un trasferimento di saturazione per i protoni guanidinici irradiando nell'intervallo 5-10 ppm dall'acqua di bulk.

#### Esempio 5

Spettro CEST di una soluzione 0.25 mM di poliarginina (DP 227) in  
5 presenza di 3.5 mM di  $[\text{DyDOTP}]^{4-}$  a pH 6.5, 312 K, 7.05 T, tempo di irradiazione 4 s.

Lo spettro (Figura 5) indica che l'effetto dello ione Dy(III) nei confronti delle risonanze dei protoni mobili guanidinici è di segno opposto rispetto all'uso dello ione Yb(III).

#### 10 Esempio 6

Spettro CEST di una soluzione 0.1 mM di poliarginina (DP 227) in presenza di 1.2 mM e 2.4 mM di  $[\text{TmDOTP}]^{4-}$  a pH 7.2, 312 K, 7.05 T, tempo di irradiazione 4 s.

Lo spettro (Figura 6) indica il marcato effetto di questo complesso sulla  
15 frequenza di risonanza dei protoni mobili guanidinici la cui irradiazione può essere condotta nell'intervallo 30-40 ppm (2.4 mM di SR).

#### Esempio 7

Dipendenza del trasferimento di saturazione (ST %) di una soluzione 6.25  $\mu\text{M}$  di poliarginina (DP 227) in funzione della concentrazione di  
20  $[\text{TmDOTP}]^{4-}$  a pH 7.2, 312 K, 7.05 T, frequenza di irradiazione 8400 Hz dall'acqua, tempo di irradiazione 4 s.

Il grafico mostra la notevole sensibilità di questo sistema in cui è possibile misurare un effetto ST del 5 % ad una concentrazione di unità SR di ca. 40  $\mu\text{M}$ .

#### 25 Esempio 8

Dipendenza dal pH del trasferimento di saturazione (ST %) di una soluzione 0.11 mM di poliarginina (DP 270) e 2 mM di  $[\text{TmDOTP}]^{4-}$ , 312 K, 7.05 T, frequenza di irradiazione 6000 Hz dall'acqua, tempo di irradiazione 4 s.

L'effetto diminuisce sensibilmente a pH acido principalmente a causa della diminuzione della velocità di scambio dei protoni guanidinici.

#### Esempio 9

Interazione tra sieralbumina umana (HSA) e  $[\text{TmDOTP}]^{4-}$  (312K, pH

5 7.4).

La figura 8 mostra il trasferimento di saturazione misurato irradiando le frequenze dello spettro NMR comprese fra 1.3 ppm e 10 ppm, per una soluzione di HSA 1 mM da sola ( $\square$ ) e dopo l'aggiunta di  $[\text{TmDOTP}]^{4-}$  in quantità 3mM ( $\blacksquare$ ). Si osserva che la frequenza alla quale si osserva il massimo di trasferimento, riconducibile all'irradiazione di protoni guanidinici di residui di Arg della proteina, si sposta di circa 2 ppm.

#### Esempio 10

Interazione tra  $[\text{TmDOTP}]^{4-}$  e  $\text{Co(en)}_3^{3+}$ .

La figura 10 indica la dipendenza dell'effetto CEST (ST %) in funzione della concentrazione per soluzioni 1:1 di  $[\text{TmDOTP}]^{4-}$  e  $\text{Co(en)}_3^{3+}$ , 298 K, pH 5.7, 7.05 T, frequenza di irradiazione 21000 Hz dall'acqua, tempo di irradiazione 4 s. In queste condizioni sperimentali un effetto CEST del 5 % è stato ottenuto ad una concentrazione di unità SR pari a 0.1 mM. A temperatura e pH fisiologici l'effetto massimo è solo del 9 % a causa della elevata velocità di scambio dei protoni aminici primari.

#### Esempio 11

Interazione tra  $[\text{TmDOTP}]^{4-}$  e Cyclen.

La figura 11 indica la dipendenza dell'effetto CEST (ST %) in funzione del rapporto di concentrazione tra Cyclen e  $[\text{TmDOTP}]^{4-}$  per una soluzione 4 mM di quest'ultimo, 312 K, pH 6, 7.05 T, frequenza di irradiazione 21000 Hz dall'acqua, tempo di irradiazione 4 s. Il massimo effetto è osservabile per rapporti di concentrazione substrato/unità SR pari a circa 3-4:1. A concentrazioni di substrato inferiori l'effetto diminuisce principalmente a

causa del ridotto numero di protoni irradiati, mentre a concentrazioni superiori l'effetto diminuisce principalmente a causa dell'aumento della frazione libera di cyclen con conseguente spostamento del segnale dei protoni mobili verso la zona diamagnetica.

5       **Esempio 12**

Interazione tra  $[\text{TmDOTP}]^{4-}$  e Cyclen.

La figura 12 illustra la dipendenza dell'effetto CEST (ST %) dalla concentrazione di  $[\text{TmDOTP}]^{4-}$  mantenendo un rapporto di concentrazione  $[\text{Cyclen}]/[\text{TmDOTP}]^{4-}$  di 3:1, 312 K, pH 6, 7.05 T, frequenza di irradiazione  
10 21000 Hz dall'acqua, tempo di irradiazione 4 s.

Il grafico mostra la notevole sensibilità di questo sistema in cui è possibile misurare un effetto ST del 5 % ad una concentrazione di unità SR di ca. 60  $\mu\text{M}$ .

**Esempio 13**

15       Interazione tra  $[\text{TmDOTP}]^{4-}$  e Cyclen.

La figura 13 mostra la dipendenza dell'effetto CEST (ST %) dal pH per una soluzione 3:1 di cyclen (12 mM) e  $[\text{TmDOTP}]^{4-}$  (4 mM), 312 K, 7.05 T, frequenza di irradiazione 21000 Hz dall'acqua, tempo di irradiazione 4 s.

L'effetto di trasferimento riflette la dipendenza della velocità di  
20 scambio dei protoni aminici dal pH, cioè diminuisce quando è troppo lento ( $\text{pH} < 5$ ) oppure quando è troppo rapido avvicinandosi alla condizione di coalescenza ( $\text{pH} > 7$ ).

**Esempio 14**

L'istogramma riportato in figura 14 mostra il confronto tra i valori di  
25 ST % per una serie di substrati interagenti con l'unità SR  $[\text{TmDOTP}]^{4-}$ , 312 K, pH 7.4, 7.05 T, tempo di irradiazione 4 s. In tutti i casi la concentrazione di  $[\text{TmDOTP}]^{4-}$  è di 4 mM mentre quella di substrato varia in funzione del rapporto di concentrazione ottimale valutato in precedenza. Triaza = 1,4,7-

14

triazaciclononano 10:1; Esaaza = 1,4,7,10,13,16-esaazaciclooctadecano 2:1;  
Cyclen 3:1; Cyclam 2:1 e Poliarginina 0.055:1.

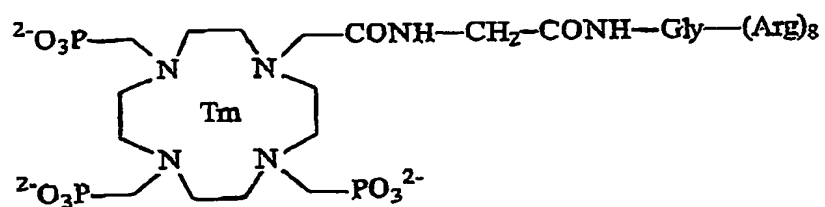
5



**RIVENDICAZIONI**

1. Agenti CEST paramagnetici costituiti da un substrato (SH) contenente protoni mobili legato a un chelato paramagnetico (SR) contenente un metallo  
5 scelto fra ferro (II) (configurazione alto spin), ferro (III), cobalto (II), rodio(II), rame (II), nickel (II), cerio (III), praseodimio (III), neodimio (III), disprosio (III), erbio (III), terbio (III), olmio (III), tulio (III), itterbio (III) ed europio (III).
2. Agenti secondo la rivendicazione 1 in cui i substrati SH siano  
10 diamagnetici e scelti fra poliamine lineari e cicliche, poliaminoacidi, proteine, polisaccaridi, poliamidoamine, poliaminoacidi peramidati, dendrimeri contenenti gruppi amidici, policiclodestrine, polisaccaridi, alginati.
3. Agenti secondo la rivendicazione 2 in cui il substrato è scelto fra poliarginina, albumina e cyclen.
- 15 4. Agenti secondo una delle rivendicazioni da 1 a 3 in cui il chelato paramagnetico è  $[LnDOTP]^{4-}$ .
5. Agenti secondo una delle rivendicazioni da 1 a 4 compartimentalizzati all'interno di sistemi biocompatibili scelti fra liposomi, nanoparticelle, microemulsioni, cavità proteiche.
- 20 6. Agenti secondo una delle rivendicazioni da 1 a 5 in cui il legame tra substrato e chelato è di tipo elettrostatico, la costante termodinamica apparente di associazione ( $K_A$ ) SR-substrato essendo superiore a 10.
7. Agenti secondo una delle rivendicazioni da 1 a 5 in cui SH sia legato covalentemente a SR.
- 25 8. Un agente secondo la rivendicazione 7 di formula:

16



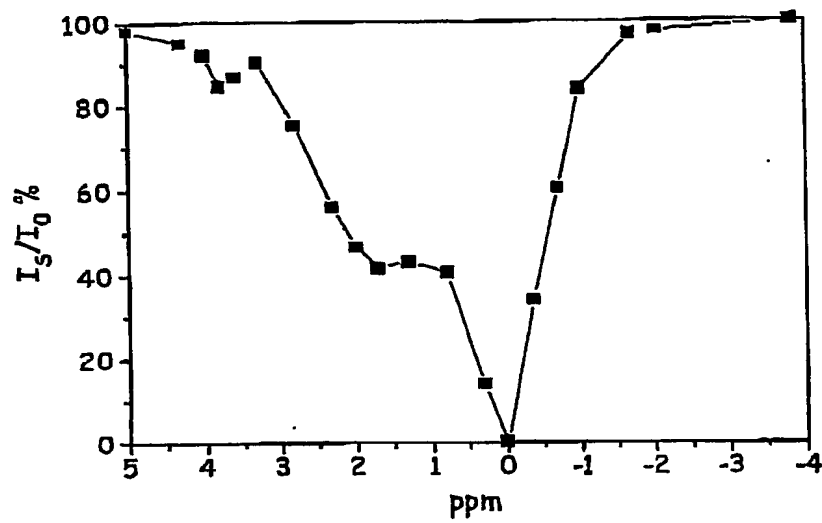
9. Una composizione diagnostica contenente un agente delle rivendicazioni 1-8 in miscela con un veicolo opportuno.

**RIASSUNTO****ADDOTTI FRA REAGENTI DI SHIFT DI RISONANZA MAGNETICA  
E SUBSTRATI CONTENENTI PROTONI SCAMBIABILI PER  
APPLICAZIONI CEST**

Si descrivono agenti CEST paramagnetici costituiti da un substrato (SH) contenente protoni mobili legato a un chelato paramagnetico (SR) 5 contenente un metallo scelto fra ferro (II) (configurazione alto spin), ferro (III), cobalto (II), rodio(II), rame (II), nickel (II), cerio (III), praseodimio (III), neodimio (III), disprosio (III), erbio (III), terbio (III), olmio (III), tulio (III), itterbio (III) ed europio (III).

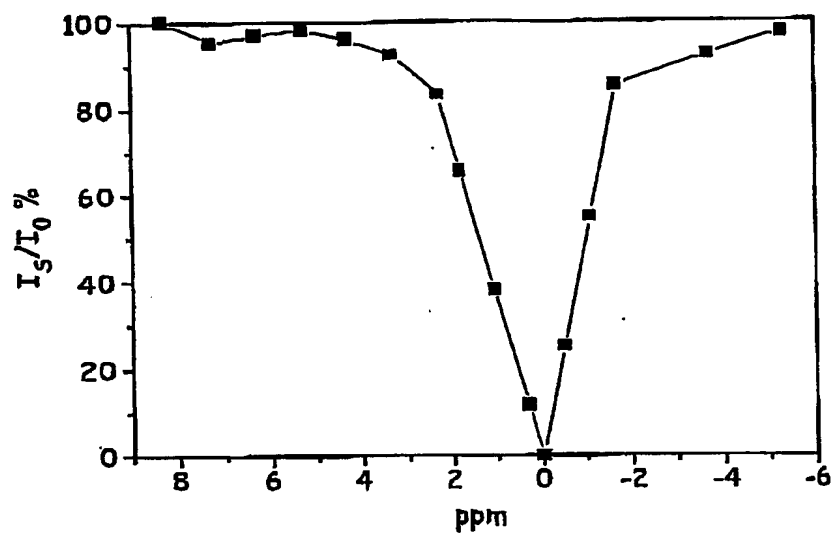
Foglio 1/14

Figura 1



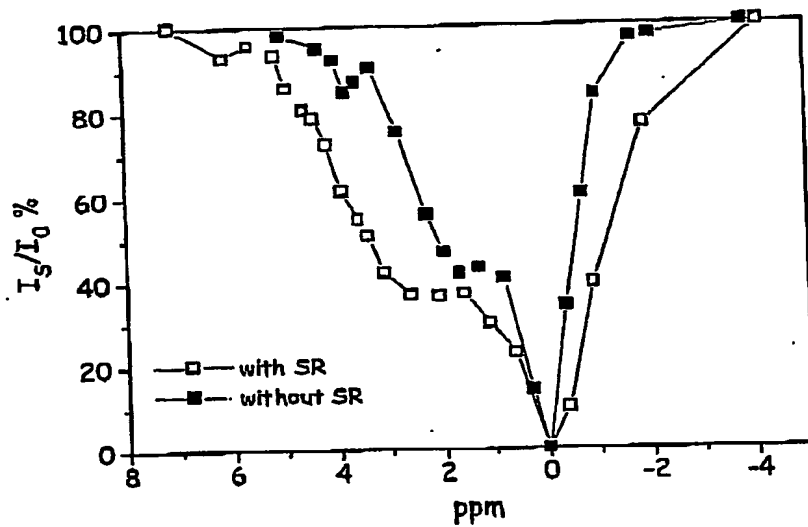
Foglio 2/14

Figura 2



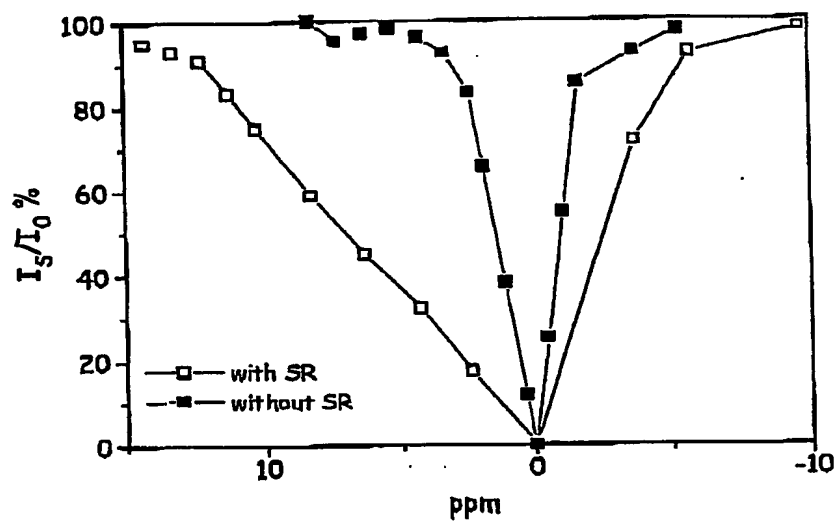
Foglio 3/14

Figura 3



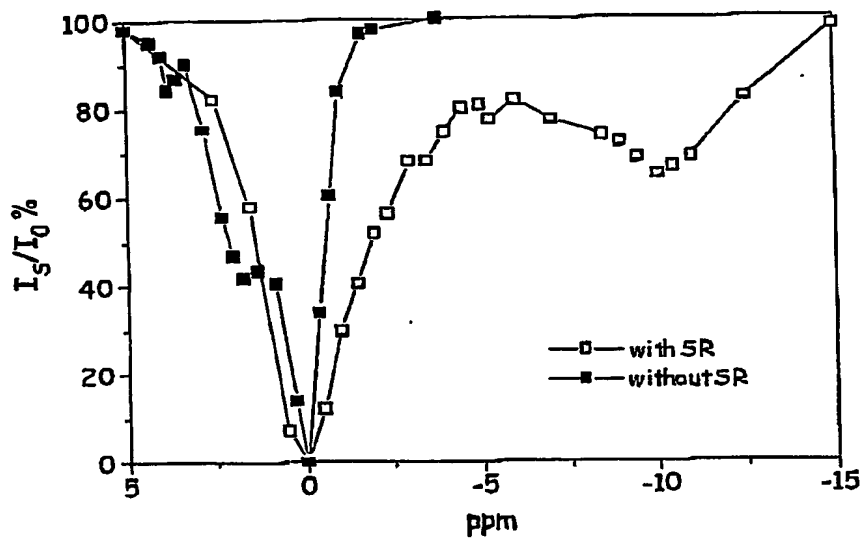
Foglio 4/14

Figura 4



Foglio 5/14

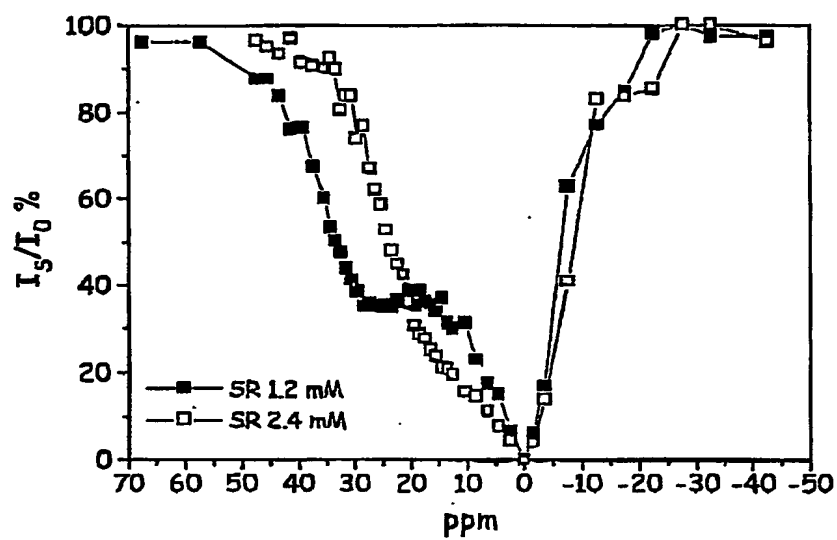
Figura 5





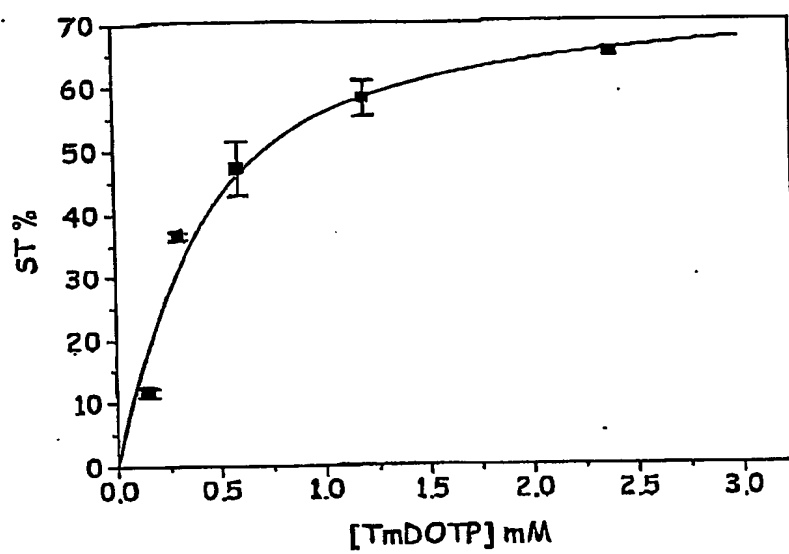
Foglio 6/14

Figura 6



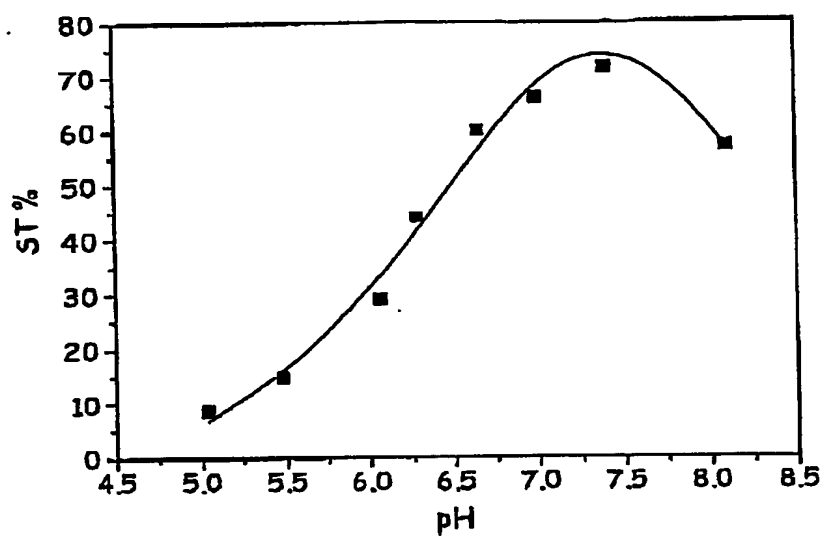
Foglio 7/14

Figura 7



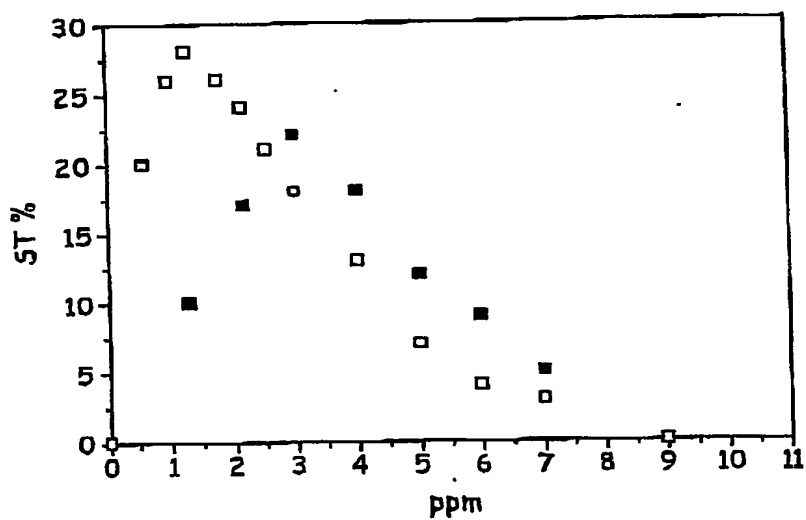
Foglio 8/14

Figura 8



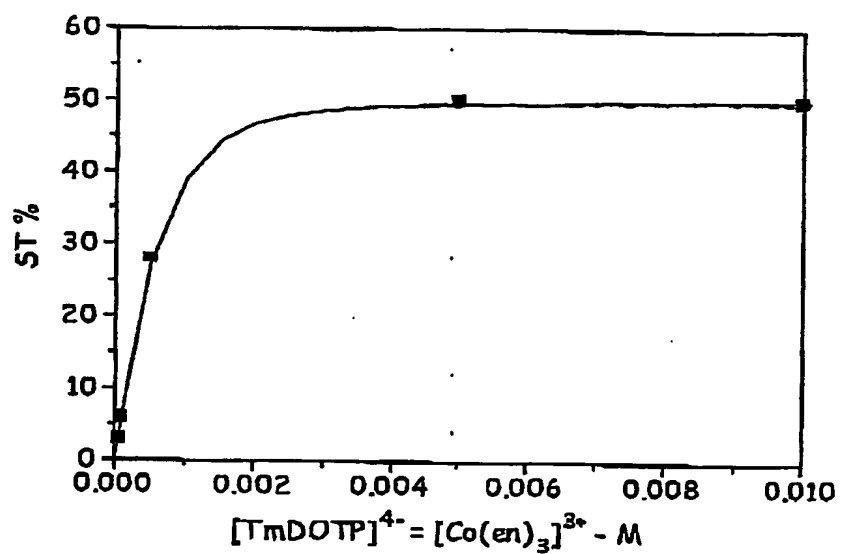
Foglio 9/14

Figura 9



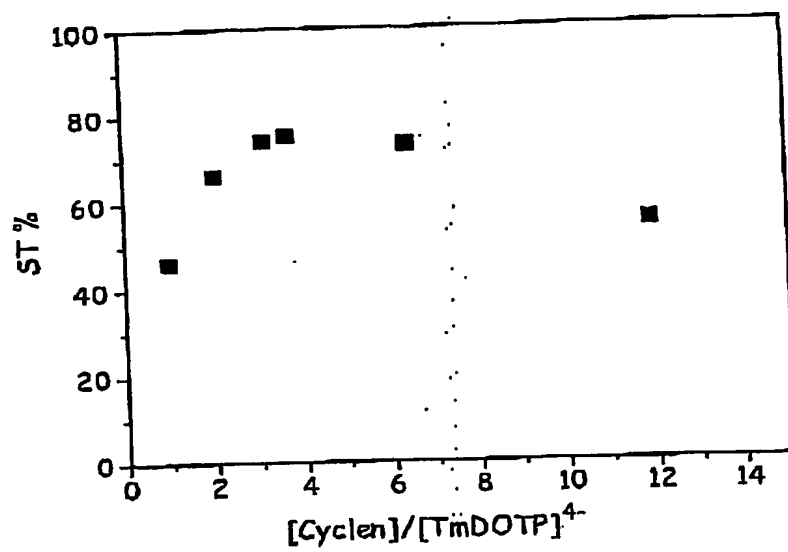
Foglio 10/14

Figura 10



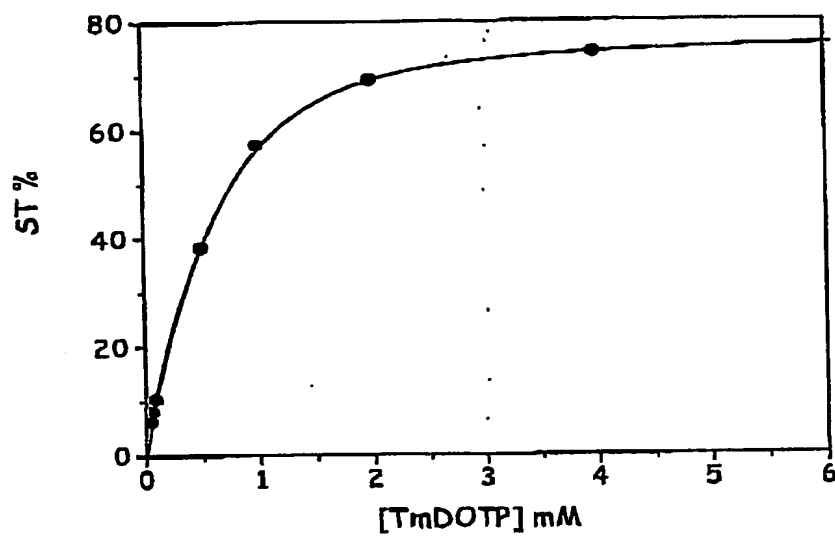
Foglio 11/14

Figura 11



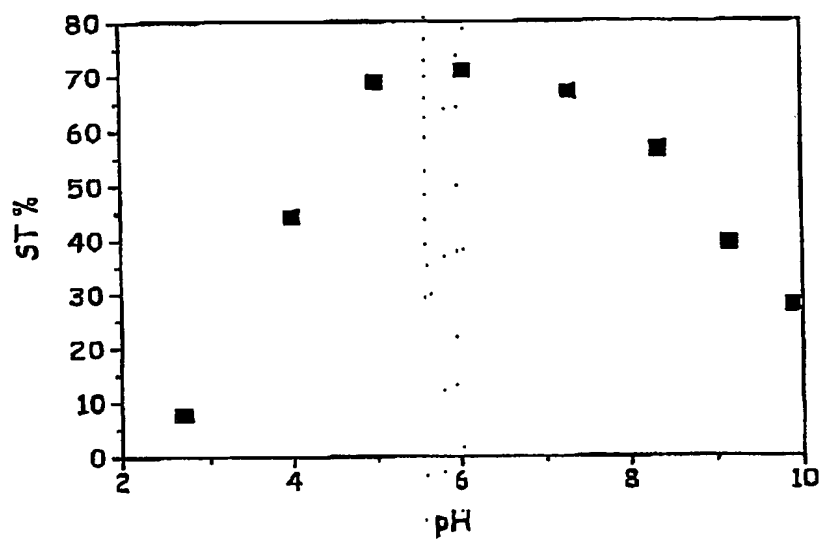
Foglio 12/14

Figura 12



Foglio 13/14

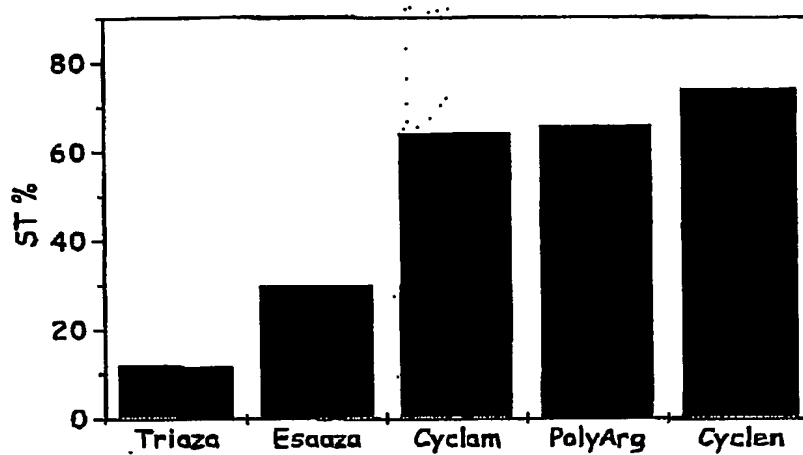
Figura 13





Foglio 14/14

Figura 14



**FOT/EP2004/003684**



This Page is inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLORED OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REPERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images  
problems checked, please do not report the  
problems to the IFW Image Problem Mailbox**